

氏名（本籍）	ひらいわ ゆきこ 平岩 由起子（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第344号
学位授与の日付	平成28年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 薬剤耐性菌感染症治療薬の探索研究

論文審査委員（主査）	教授	横松	力
	教授	林	良雄
	教授	野口	雅久
	教授	三巻	祥浩

論文内容の要旨

ペニシリンの発見以来、多くの抗菌薬開発により、感染症による死亡率は低下した。しかし、高齢化社会に伴い、近年、肺炎が死亡原因の第3位となり、感染症治療は医療現場での重要性が増している。また、薬剤耐性菌による感染症の治療は困難な場合が多く、新規感染症治療薬の開発が望まれている。本研究では、薬剤耐性緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に着目し、これらの感染症に有効な治療薬の創製を目的に新規アミノグリコシド系抗菌薬（AG薬）およびメタロβ-ラクタマーゼ（MBL）阻害剤の探索を行った。

第1章 新規アミノグリコシド系抗菌薬の探索^{1), 2), 3)}

AG薬は、細菌のrRNAと結合し、タンパク質合成の阻害により、抗菌作用を示す。しかし、AG薬は、細菌が産生するAG修飾酵素による不活化を受け、その効力が低下することが知られている。特にMRSAは、二機能性酵素AAC(6')-APH(2'')を産生し、多くのAG薬に対して薬剤耐性を有する。AG薬の中で、アルベカシン(ABK)は、AAC(6')-APH(2'')に対する高い安定性を有し、抗MRSA薬として使用されている。しかし、ABKは、AAC(6')-APH(2'')およびAAD(4',4'')を大量に産生する一部のMRSA株に対して、MIC値が高値を示すことが知られている。rRNAとの結合力を維持し、これらの修飾酵素に対する安定性をさらに高めることができれば、広いスペクトルを有するAG薬の創製に繋がると考えられる。そこで本研究では、ABKをリード化合物とした以下の化学修飾を検討し、AAC(6')-APH(2'')に対する高い安定性および強い短時間殺菌力を有するAG薬の創製に成功した。

1-1 化学修飾のデザイン

AG薬とrRNAとの共結晶のX線結晶構造情報から、ABKの5位ヒドロキシ基はrRNAとの

結合に直接関与していないことが推測された。そこで、5位ヒドロキシ基近傍の化学修飾を行った。化学修飾のデザインは、5位アクシャル配置へ置換基を導入すると、2''位のヒドロキシ基が立体的に遮蔽され、AAC(6')-APH(2'')に対する安定性が増強するとの作業仮説に基づいている (Fig. 1)。

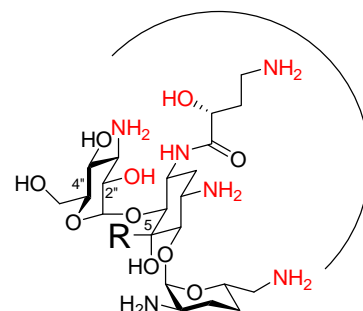


Fig 1 Design of new ABK derivatives
(ABK: R=H)

1-2 ABK類縁体の抗菌活性

以上の作業仮説に基づき、5位ヒドロキシ基の付け根炭素にアクシャル配置に置換基 (R) を導入したABK類縁体**1**、5位ヒドロキシ基を除去してアクシャル配置に置換基 (R) を導入したABK類縁体**2**およびABK類縁体**2**の4''位のヒドロキシ基を立体反転させたABK類縁体**3**を合成した。Table 1に代表的ABK類縁体**1a-3a**の構造とその抗菌活性を示す。

Table 1. Structures and MICs of ABK and ABK derivatives

		A	B	X	Y
	1a	CH ₂ OH	OH	H	OH
	2a	OH	H	H	OH
	3a	OH	H	OH	H
	ABK	H	OH	H	OH

Test organism	MIC (μg/ml)			
	1a	2a	3a	ABK
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC-1	0.25	0.06	0.06	0.06
<i>S. aureus</i> MF490 (MRSA)	32	2	1	64
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	4	1	0.5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	8	2	1	2
<i>P. aeruginosa</i> N101 (ΔmexXY of PAO1)	NT	0.25	0.25	0.25

ABK類縁体**1a**、**2a**および**3a**の抗菌活性は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) で評価した。ABK類縁体**1a**は、予想どおりAAC(6')-APH(2'')およびAAD(4',4'')産生MRSA株(*S. aureus* MF490)に対する抗菌活性がABKよりも向上する傾向がみられた。しかし、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)に対する抗菌活性は低下した。この傾向は他の置換基を導入したABK類縁体**1**でも観察された。この結果は、5位近傍に極性基が多く存在するため分子の極性が変化し、緑膿菌の菌体内への透過性が低下したと考えられる。一方、5位エクアトリアル配置のヒドロキシ基を除去して極性を低減させたABK類縁体**2a**は、*S. aureus* MF490(MRSA)に対する抗菌活性がさらに向上した。また、*P. aeruginosa* PAO1に対する抗菌活性もABKと同等の活性まで向上することが明らかとなった。ABK類縁体**3a**は、*S. aureus* MF490(MRSA) および、グラム陰性菌に対する抗菌活性が、さらに向上する傾向が認められた。

1-3 ABK 誘導体 **3a** の高次評価

3a および既存の AG 薬を用いて、AAC(6')-APH(2'')触媒下の酵素反応生成物の LCMS 解析により、**3a** は他の AG 薬と比較して本酵素に対して高い安定性を示すことが定量的に明らかとなった。また、**3a** は臨床分離株に対する感受性分布試験において、強い抗菌活性を示した。さらに、**3a** は ABK やバンコマイシン等既存の抗 MRSA 薬と比較して、強い短時間殺菌力を示した。以上の結果から **3a** は薬剤耐性菌感染症治療薬として効果が期待できる薬剤であると考えられる。

第 2 章 メタロ β -ラクタマーゼ阻害剤の探索^{4), 5), 6)}

カルバペネム系薬は、AG薬とともに緑膿菌に対し有効な薬剤である。しかし、カルバペネム系薬は、緑膿菌の産生する MBL により加水分解されその薬効を消失する。MBL 阻害剤とカルバペネム系薬の併用療法は、カルバペネム系薬の薬効保持が期待され、薬剤耐性緑膿菌感染症に対する治療法の 1 つとして有用と考えられる。しかし、カルバペネム系薬と併用可能な MBL 阻害剤はこれまで開発されていなかった。これは、緑膿菌菌体内への薬物透過性などで優れた MBL 阻害剤が見いだされなかったためであると考えられる。本研究では薬物透過性などで優れた物理化学的特性を有する MBL 阻害剤の探索を行った。なお、本研究では、MBL のうち、日本国内で最も多く検出されている IMP-1 を標的とした。

2-1 リード化合物の発見と構造展開部位の特定

IMP-1 阻害活性ならびに IMP-1 産生大腸菌および緑膿菌の異物排出ポンプ欠損株に対する β -ラクタム系薬セフトジジム (CAZ) 及びメロペネム (MEPM) の活性保持効果を指標として、社内化合物ライブラリーについて、HTS を実施した。その結果、フタル酸誘導体 **A** がリード化合物として見出された。化合物 **A** の 2 つのカルボキシ基は IMP-1 の活性中心に存在する Zn と結合し、阻害活性に関与していると考えられた。そこで、ベンゼン環上の 3 位および 4 位の置換基について構造活性相関を検討したところ、IMP-1 阻害活性の発現に 3 位の置換基が必須であることが明らかとなった。

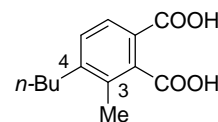


Fig.2. Structure of A

2-2 フタル酸誘導体の活性評価

以上の知見を踏まえて、3 位置換基の構造展開を検討した。3 位置換フタル酸誘導体として、炭素-炭素結合で置換基を導入した 3C-フタル酸誘導体 **42**、炭素-酸素結合で置換基を導入した 3O-フタル酸誘導体 **43**、および炭素-窒素結合で置換基を導入した 3N-フタル酸誘導体 **44** および **45** を系統的に合成した。これらの誘導体は、1) IMP-1 阻害活性および 2) 誘導体共存下での IMP-1 産生緑膿菌に対するカルバペネム系薬ピアペネム (BIPM) の MIC で抗菌活性を評価した。また、3) 誘導体共存下での IMP-1 産生緑膿菌の異物排出ポンプ mexAB 欠損株に対する BIPM の MIC の評価により、薬物透過性を評価した。代表的な誘導体の構造と評価結果を Table 2 に示す。3C-フタル酸誘導体では、脂溶性の高いフェニル基を導入した誘導体 **42b** が強い IMP-1 阻害活性を示した。特に 4-ヒドロキシフェニル基を有す

る**42d**は強い阻害活性とBIPMの抗菌活性の強い保持効果が観察された。しかし、水溶解性が低い難点があった。

3O-フタル酸誘導体**43**では、末端に脂溶性の高いフェニル基を有するアルキル鎖を導入した誘導体**43g**が強いIMP-1阻害活性を示した。

しかし、**43g**共存下で、BIPMの抗菌活性はmexAB欠損株に対しては強かったが、mexAB発現株に対しては

低下した。**43g**は異物排出ポンプにより排出を受けやすい誘導体と考えられた。一方ヒドロキシプロピル基を有する**43k**は、IMP-1阻害活性が弱いものの、異物排出ポンプの影響を受けにくいことが示唆された。2級アミンを置換した誘導体のIMP-1阻害活性は弱く、また、異物排出ポンプの影響を受けやすいことが示唆された。しかし、3級アミン誘導体**44e**は、IMP-1阻害活性は低いものの、共存下で、異物排出ポンプmexABの有無に関わらず、BIPMの抗菌活性を保持する効果が観察された。**44e**は異物排出ポンプの影響を受けにくいことが明らかとなった。そこで3級アミン誘導体について更に構造展開したところ、フタル酸3位に4-ヒドロキシピペリジニル基を有する**45e**は高いIMP-1阻害活性を示すことを見出した。また、**45e**は、IMP-1産生緑膿菌に対するBIPMの強い抗菌活性を保持し、水溶解性にも優れており、IMP-1阻害剤として優れたプロファイルを有していることが確認された。

2-3 3N-フタル酸誘導体 **45e** の高次評価

IMP-1と**45e**の複合体のX線結晶構造解析を行った。この解析結果をもとに、フタル酸3位と6位へ4-ヒドロキシピペリジニル基を導入したフタル酸誘導体**67**を合成・評価した。**67**のIMP-1阻害活性は**45e**と比較し、約10倍向上することを確認した。しかし、**67**共存下でのIMP-1産生緑膿菌に対するBIPMのMICは、**45e**共存下でのMIC値と同等であった。そこで、**45e**を開発候補化合物として選択し、**45e**共存下で、 β -ラクタム系薬（CAZ、MEPM、およびBIPM）のIMP-1産生緑膿菌（臨床分離株）14株に対する感受性分布試験を行った。その結果、単剤での抗菌活性と比較し、すべての薬剤で抗菌活性が向上した。中でも、BIPMとの組み合わせが最も好ましいことが明らかとなった。

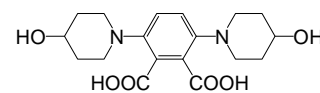
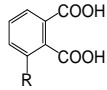

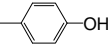
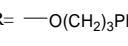
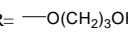
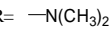
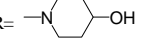


Fig 3. Structure of **67**

結論

以上、ABK の 4"位および 5 位の水酸基を立体反転させた **3a** は、AAC(6')-APH(2")に安定であり、緑膿菌および MRSA の臨床分離株に対して強い抗菌活性を示すことを明らかにした。また、HTS で見出したリード化合物 **A** の合成展開により、菌体内への薬物透

Table 2. Activities of 3-substituted phthalic acid derivatives

	IC ₅₀ (μM) for IMP-1	MIC(μg / mL) of BIPM with inhibitor (50 μg / mL)	
		<i>P.aeruginosa</i> KG5002/ pMS363 ΔmexAB	<i>P.aeruginosa</i> PAO1/ pMS363 mexAB(wild type)
42b R= 	1.00	≤0.5	2
42d R= 	1.50	≤0.25	1
43g R= 	1.70	0.5	64
43k R= 	21.4	16	16
44e R= 	94.5	4	4
45e R= 	2.70	≤0.25	1

過性などで優れた物理化学的特性を有する MBL(IMP-1)阻害剤 **45e** の創製に成功した。**45e** は、IMP-1 産生緑膿菌に対して、 β -ラクタム系薬と共に使用すると、 β -ラクタム系抗菌薬の抗菌活性を保持する機能を有することが明らかとなった。

本研究で得られた知見は、MRSA および耐性緑膿菌に対する治療薬の新しい選択肢の一つを提供するものであり、学術的な意義を有するものと考えている。

【研究結果の掲載誌】

1) *Heterocycles* (2007), **71**(8), 1715. 2) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2007), **17**, 3540. 3) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2007), **17**, 6369. 4) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2009), **19**, 5162. 5) *Bioorg. Med. Chem.* (2013), **21**, 5841. 6) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2014), **24**, 4891.

論文審査の結果の要旨

高齢者の肺炎は、近年死亡原因の上位を占めている。肺炎の原因菌として緑膿菌が検出される場合が多く、さらに、既存の抗菌薬に対して耐性を示す薬剤耐性緑膿菌が増加する傾向にある。平岩由起子氏の博士学位申請論文は、これらの薬剤耐性緑膿菌に有効な治療薬を提供する目的で、アミノグリコシド系抗菌薬（AG 薬）の化学修飾を検討した結果と新規メタロ β -ラクタマーゼ阻害剤の探索研究について述べている。

第 1 章では、医療現場で薬剤耐性緑膿菌と共にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）が同時に検出されることが多いことを踏まえて、これらの薬剤耐性菌に広いスペクトルを有する AG 薬の創製を検討している。申請者は AG 薬アルベカシン（ABK）が、抗緑膿菌活性と抗 MRSA 活性を併せ持つことに注目して、ABK をリードとして AG 修飾酵素に対する安定性を高める化学修飾を検討した。特に、B 環 6'位と C 環 2"位のヒドロキシ基をそれぞれ同時にアセチル化およびリン酸化する二機能性酵素（AAC(6')-APH(2'')) と C 環 4"位のヒドロキシ基をアデニル化する AG 修飾酵素（AAD(4',4'')) に対する安定性を向上させる新規化学修飾を試みている。広範な構造活性相関の検討から、ABK の 5 位および 4"位のヒドロキシ基を共に立体反転させた新規 ABK 類縁体 3a は、高度耐性 MRSA 株が産生する AG 修飾酵素（AAC(6')-APH(2'') と AAD(4',4'')) に対する安定性が飛躍的に向上することを見出している。また、MRSA 臨床分離株（54 株）に対する 3a の抗菌活性は、臨床で使用されている抗 MRSA 薬（バンコマイシンおよびテイコプラニン）の抗菌活性よりも向上することを見出している。さらに、3a は、緑膿菌臨床分離株（54 株）に対しても、臨床で使用されているカルバペネム系抗菌薬（イミペネム）と比べて強い活性を示すことを明らかにしている。3a は、強い短時間殺菌力も有することから、MRSA および薬剤耐性緑膿菌感染症の治療に貢献できる薬剤として開発が期待される。

第 2 章では、薬剤耐性緑膿菌による β -ラクタム系抗菌薬の不活化メカニズムのうち、メタロ β -ラクタマーゼ（MBL）による β -ラクタム系抗菌薬の環開裂反応に注目している。MBL 阻害剤は、 β -ラクタム環の開裂反応を阻害して、 β -ラクタム系抗菌薬の抗菌活性保持に役立つ薬剤として開発が期待されている。しかし、現在、MBL 阻害剤は臨床で使用されていない。主な原因は、菌体内への薬物移行性や水溶解性で好ましい MBL 阻害剤が開発されていないことによる。申請者は、社内化合物ライブラリーからハイスループットスクリーニング（HTS）により MBL 阻害活性物質を抽出した。その後、抽出された MBL 阻害活性物質について、 β -ラクタム系抗菌薬メロペネムが共存する系の MBL(IMP-1 型)産生大腸菌と MBL(IMP-1 型)産生緑膿菌（異物排出ポンプ欠損株）に対する抗菌活性を指標として、再度 HTS を実施して、リード化合物 3-メチル-4-ブチルフタル酸誘導体 A を抽出した。A の構造活性相関を検討したところ、4 位のブチル基を除去して、3 位に 4-ヒドロキシピペリジニル基を導入したフタル酸誘導体 45e が、強い MBL(IMP-1 型)阻害活性を有し、さらに、菌体内への薬物移行性

および水溶解性でも優れたプロファイルを示すことを見出している。また、 β -ラクタム系抗菌薬ピアペネムは、**45e** が共存すると、**MBL(IMP-1 型)**産生緑膿菌による不活化を受けず、本来の抗菌活性が維持されることを明らかにしている。さらに、**IMP-1** 産生緑膿菌臨床分離株（14 株）に対する β -ラクタム系抗菌薬の感受性分布試験においても、**45e** とピアペネムを組み合わせると、抗菌活性の保持に役立つことを検証している。**45e** は、 β -ラクタム系抗菌薬の活性保持に有効な **MBL** 阻害剤として、初めて効果が確認された薬物である。

ここで述べられている研究成果は、メディシナルケミストリー分野の新知見を有するばかりか、**MRSA** および薬剤耐性緑膿菌に対する治療薬の新しい選択肢を提供するものである。従って、本論文は、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと判断する。